植物保護學會會刊 30：15—23，1988

豌豆萎凋病菌之變異與存活*

林益昇[1]　汪碧涵[2]　羅朝村[1]

1.臺灣省農業試驗所植病系，臺中縣；2.私立東吳大學微生物系，臺北市

（接受日期：民國76年11月 7 日）

摘　　要

林益昇、汪碧涵、羅朝村　1988　豌豆萎凋病菌之變異與存活　植保會刊 30：15—23.

臺灣豌豆萎凋病菌之野生型菌落為胞叢型，單胞培養子代會變異成數種菌落形態。粘膜菌絲型為不穩定的中間型，會產生胞叢型或繼續變異為粘膜型。粘膜型為穩定的變異型。變異頻率與培養日數成正比。胞叢型對豌豆（臺中十一號）表現最強的致病力（virulence），粘膜菌絲型次之，而以粘膜型最低。又胞叢型菌株，不論在高壓殺菌土或自然土（土壤含水量為 8—10%）均能存活良好，但粘膜型菌株則無法存活。另外，芹菜黃葉病菌及甘藷蔓割病菌之粘膜型與胞叢型菌株在高壓殺菌土或自然土中之存活無差異，或是粘膜型菌株之存活更好，在18個月內，其族群數目仍維持在 10^3 propagules/g of soil。西瓜蔓割病菌之變異與豌豆萎凋病菌相似，但存活不同。

關鍵字：豌豆、鐮胞萎凋病菌、變異、致病力、存活。

緒　　言

許多鐮胞菌屬（Fusarium）眞菌，在人工培養基上之生長、形態及生理特性都容易產生變異，尤其萎凋病菌會產生多種變異型[11]。其變異型態大致可分為胞叢型（sporodochial type）、菌核型（sclerotial type）、白色菌絲型（cottony alba type）、粘膜菌絲型（ropy mycelial type）及粘膜型（pionnotal type）[1,3,4,5,20,21,22]。前人研究 *Fusarium* 粘膜型變異菌株，都強調是在培養基上產生的現象，甚少在田間獲得[8]。臺灣豌豆萎凋病菌大都是擬萎凋病菌(*F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Linford) Snyd. and Hans. race 2）及其衍生出來的生理小種[13]。Snyder[19] 報告該菌之野生菌株（wild type），亦即最初自田間標本或土壤分離所得之菌株，其培養性狀及致病力（virulence）互有差異。作者自本省田間分離數百個豌豆萎凋病菌之菌株，其培養性狀偶而也有差異[13]，但都屬於胞叢型，在馬鈴薯瓊脂培養基（PDA）上產生氣生菌絲及胞叢，經過一段時間的培養，會變成常見之粘膜型之菌落形態。Leonian[11]發現若干鐮胞菌單胞子代之菌落形態與致病力互有差異，子代的致病力可增加，降低或仍與母株相同，卻無相關性可言。但後來許多研究[1,3,4,5,14,20,22]指出許多 *Fusarium* 病原菌，包括 *F. oxysporum* f. sp. *pisi*[10]之粘膜型菌株之致病力皆遜於原有之母株（野生型），卻鮮有進行其存活試驗。但仍有研究報告指出不同種類鐮胞菌之粘膜型變異菌株尚擁有與原有野生型母株相同之病原性，卻無法在自然土中存活[12,14]，也有存活能力

* 臺灣省農業試驗所研究報告 1356 號。

無差異者[1,4]。本文研究豌豆萎凋病菌之變異，及若干萎凋病菌粘膜型變異菌株之存活，提供更多的證據供爲參考。

材 料 與 方 法

豌豆萎凋病菌之變異型與變異方向

從田間標本分離得 *F. oxysporum* f. sp. *pisi*，並經接種於判別品種[13]上，證實爲race 2，在農試所土傳性病害研究室編號爲Fop-67之菌株爲供試菌。單孢培養在 PDA 斜面上，維持 22°C，2000 lux/12 hr/day 之照光，三週後觀察各菌株之變異情形，並將各變異菌株再予以單孢培養，繼續觀察與記錄。另外，將野生型菌株培養在 PDA 斜面上，經4、40、80、100、或 190 天後，各挑取 30 管單孢培養，檢視各齡菌株之變異頻率。

野生型及變異型菌株致病能力之比較

取野生型菌株，Fop-67，及其變異菌株爲供試材料，在 24°C，70% R.H., 16,000 lux/14 hr/day 之植物生長箱（Conviron SIOH 型）內進行接種試驗。

1. 浸根接種法（dip and prune inoculation）：將表面消毒（95%酒精與 5.25%次氯酸納（1：1，v/v）溶液，15 sec）的臺中十一號豌豆種子，種植於珍珠石（perlite）裡，10 天後，待幼苗成長達四～五節時，小心挖出，將根部浸泡於供試菌之孢子懸浮液（10^5 spores/ml）中，同時切除距離子葉 4 cm 以下之根系，再重新種植於無菌的珍珠石上。容器採用特製的黑木箱[13]，方便操作及保持水分。每箱 10 棵，5 重複，每週澆 Hoaglund's solution 一次。

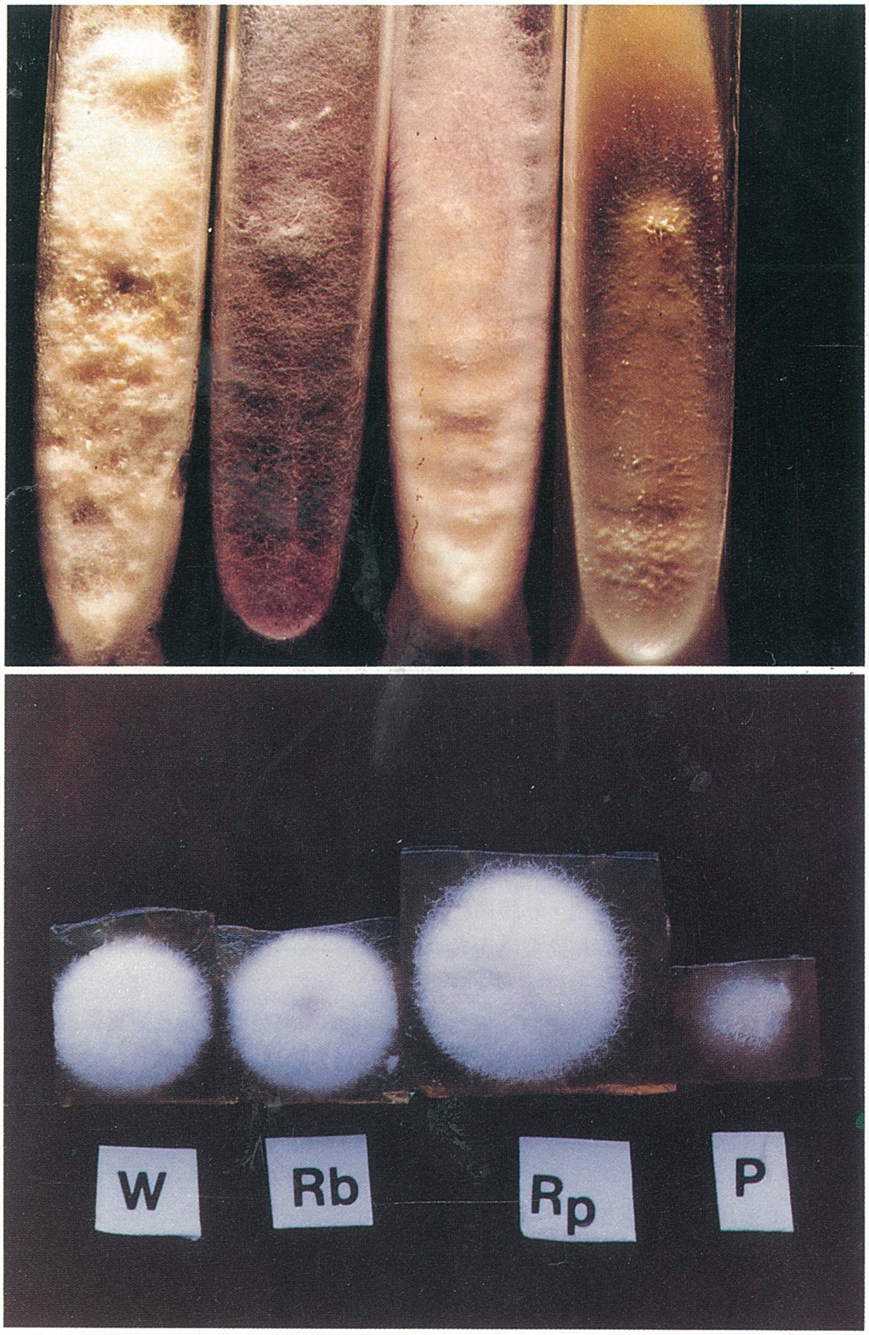
2. 土壤接種法（soil infestation）：將供試菌株單孢培養於 PDA 上 2 週後，分別移植於消毒過之玉米砂培養基（Sand, 100 g; Cornmeal, 3 g; Distilled water, 15 ml）。在實驗室裡培養 2 週後，與不含病原菌的處女土（砂質壤土）均勻混合（1：5，v/v）。靜置於實驗室內 10～14 天，以 PCNB 培養基[12]測定含菌量，再以處女土調節其含菌量至 10^3 propagules/g of soil，再裝入內徑 20 cm 的花盆裡，播植經表面消毒之豌豆種子（臺中十一號），再覆蓋一層輕砋石（vermiculite），以保持濕度。每盆10粒種子，5重複，兩天澆水一次，隔週並澆以 Hoaglund's solution 一次。觀察，記錄病勢之進展，並重新分離、鑑定病原菌。病害調查依葉片黃化高度佔株高的比例，每 25%爲一級，分爲 0—4 級，全株死亡列爲第 5 級，計算發病率（disease percentage）[9]：

$$\text{發病率}(\%)=\frac{\text{各株發病級數之和}}{\text{植株數}\times 5}\times 100$$

數種萎凋病菌野生型及變異菌株存活能力之測定

供試菌包括 *F. oxysporum* f. sp. *pisi*（Fop-67），*F. oxysporum* f. sp. *apii*（Ne. and Sherb.）Snyd. and Hans.（Foa），*F. oxysporum* f. sp. *batatas*（Wr.）Snyd. and Hans.（Fob）和 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*（E. F. Smith）Snyd. and Hans.（Fon）。後三個菌株取自中興大學植病系病原生態研究室。由於 PCNB 選擇性培養基[16]不適合豌豆萎凋病菌各類型菌落形態之辨認，遂先行篩選適合之培養基，結果以 ARB-C 選擇性培養基[18]，各菌落形態之差異最爲顯着（圖一），故選用之。其配方爲 Dehydrated trypticase-soy broth, 30 g; Yeast extract, 5 g; K_2HPO_4, 1.5 g; Agar, 15 g; Distilled water, 1000 ml; pH 7.6。消毒後添加 PCNB, 100 ppm; Chlorotetracycline MCI, 100 ppm; Neomycin, 100 ppm。其他三個病原菌則以 PCNB 培養基測定。

將豌豆萎凋病菌，Fop-W（野生型），Fop-Rb（褐色粘膜菌絲型），Fop-Rp（紫色粘膜菌絲型），及 Fop-P（粘膜型），及芹菜黃化萎凋病菌（Foa），甘藷蔓割病菌（Fob）、西瓜蔓割病菌（Fon）等之野生型及粘膜型菌株，於消毒後之玉米砂培養基培養 30 天。然後將之與田土（壤土，取自農試所農場之玉米田），或經高壓殺菌之田土（15 lb, 121°C, 20 min），以 1：4（v/v）之比例均勻混合，隨即使用 ARB-C 或 PCNB 培養基測定其含菌量。然後置於用錫箔紙封口之 250 ml 的三角瓶內，土壤濕度調節爲10%含水量。爾後每 2



圖一、豌豆萎凋病菌在 PDA 培養基（上）及 ARB-C 培養基（下）上的四種菌落形態。W＝野生型；Rb＝褐色粘膜菌絲型；Rp＝紫色粘膜菌絲型；P＝粘膜型

Fig. 1. Four cultural types of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 on PDA (upper row) and ARB-C media (bottom row). W=Wild type; Rb=Brown ropy type; Rp=Purplish ropy type; P=Pionnotal type

個月測定其含菌量一次，此時土壤含水量降至8％左右，採樣後再加水調整爲10％含水量。

結　　果

豌豆萎凋病菌之變異類型與變異方向

本省豌豆萎凋病菌在 PDA 上之表現型可以歸納爲胞叢型（野生型），與變異的粘膜菌絲型及粘膜型，其特性列於表一。將胞叢型及粘膜菌絲型之菌株單孢培養，其子代均有胞叢型，粘膜菌絲型及粘膜型出現；粘膜型的子代則都是粘膜型，並不能產生胞叢型或粘膜菌絲型，其變異方向爲：

胞叢型⟷粘膜菌絲型⟶粘膜型
（胞叢型 ⟶ 粘膜型）

表一、豌豆萎凋病菌在 PDA 培養基上培養三星期菌落形態之特性

Table 1. Characteristics of cultural types of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 on potato dextrose agar after 3 weeks

Clone type	Character				
	Sporodochia	Pionnote	Aerial mycelium	Pigmentation	Macrospore
Sporodochial	Yes	No	Abundant Floccose Salmon	Dark purple	Abundant
Ropy	No	No	Abundant Ropy Brown (Rb) or Purple (Rp)	Purplish brown	Scant
Pionnotal	No	Yes	Scant Appressed Orange	White	Abundant Abnormal

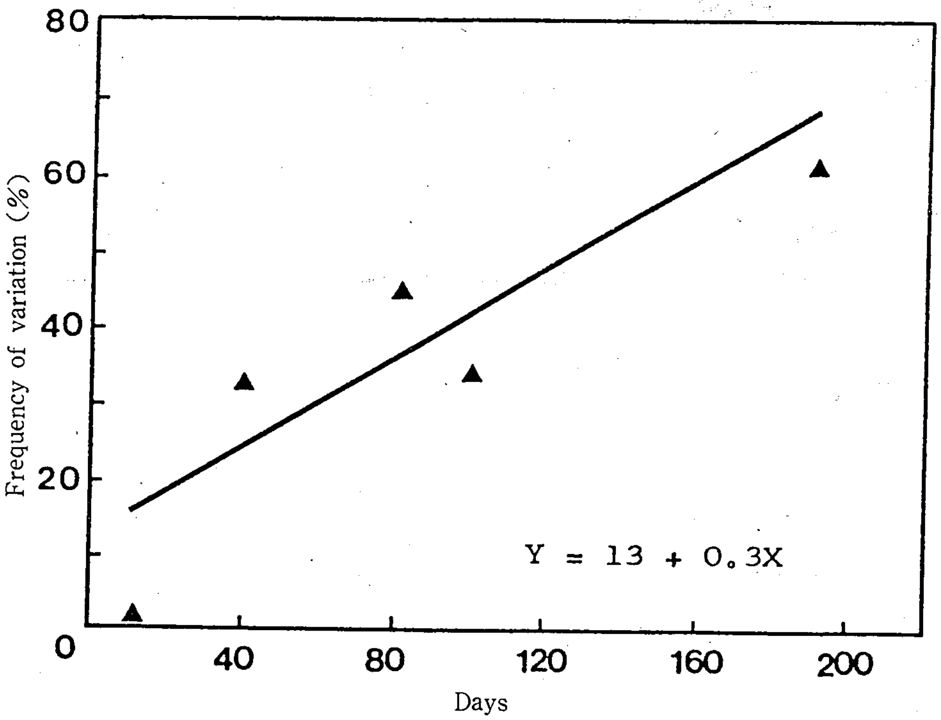
由上述可知，胞叢型爲野生型，粘膜菌絲型爲變異中間型（不穩定），而粘膜型爲變異終極型（穩定）。在本試驗之培養條件下，野生型會逐漸產生變異，變異頻率隨時間而增加，第十四天爲 3.3％，四十天爲 33.3％，八十天爲 46.3％，到第一百九十天其變異率高達62.1％（圖二）。亦即變異頻率與培養時間成正比。

野生型及變異型菌株致病力之比較

野生型菌株，不論在無菌狀況（浸根接種法），或者在含有許多微生物的自然土裡（土壤接種法），都表現極強的致病力，發病指數分別爲 100％及 80％。變異型菌株中，褐色粘膜菌絲型的致病力在無菌狀況下之發病指數爲100％，與野生型菌株沒有差異，但在有其他微生物的自然土中，其致病力卻降至 35％。另外，紫色粘膜菌絲型與粘膜型菌株之致病力於二種接種方法狀況下均大爲降低，分別爲40％與25％，或者僅有12％與 9 ％之發病率（表二）。

數種萎凋病菌野生型及變異型菌株存活能力之比較

由於豌豆萎凋病菌粘膜菌絲型屬於不穩定的中間型，其族群在土壤裡表現不穩定，故本試驗只取胞叢型及粘膜型菌株之存活結果。供試病原菌 Foa, Fob, Fon 及 Fop 之胞叢型及粘膜型菌株，在土壤中之最初濃度皆調整爲 10^5 propagules/g of soil，在 18 個月內，其族群變化互有差異（圖三）。以胞叢型菌株而言，其族群數目都有下降，以 Foa 下降最多，但是仍維持在 10^3 propagules/g of soil 以上，存活良好。但是粘膜型菌株的族群則變化甚大，不論在消毒土或自然土中，Fon 之粘膜型菌株與胞叢型菌株之存活無差異，而 Foa



圖二、豌豆萎凋病菌在 PDA 培養基上培養時間與變異頻率的關係

Fig. 2. Frequency of variation in relation to age of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 on PDA

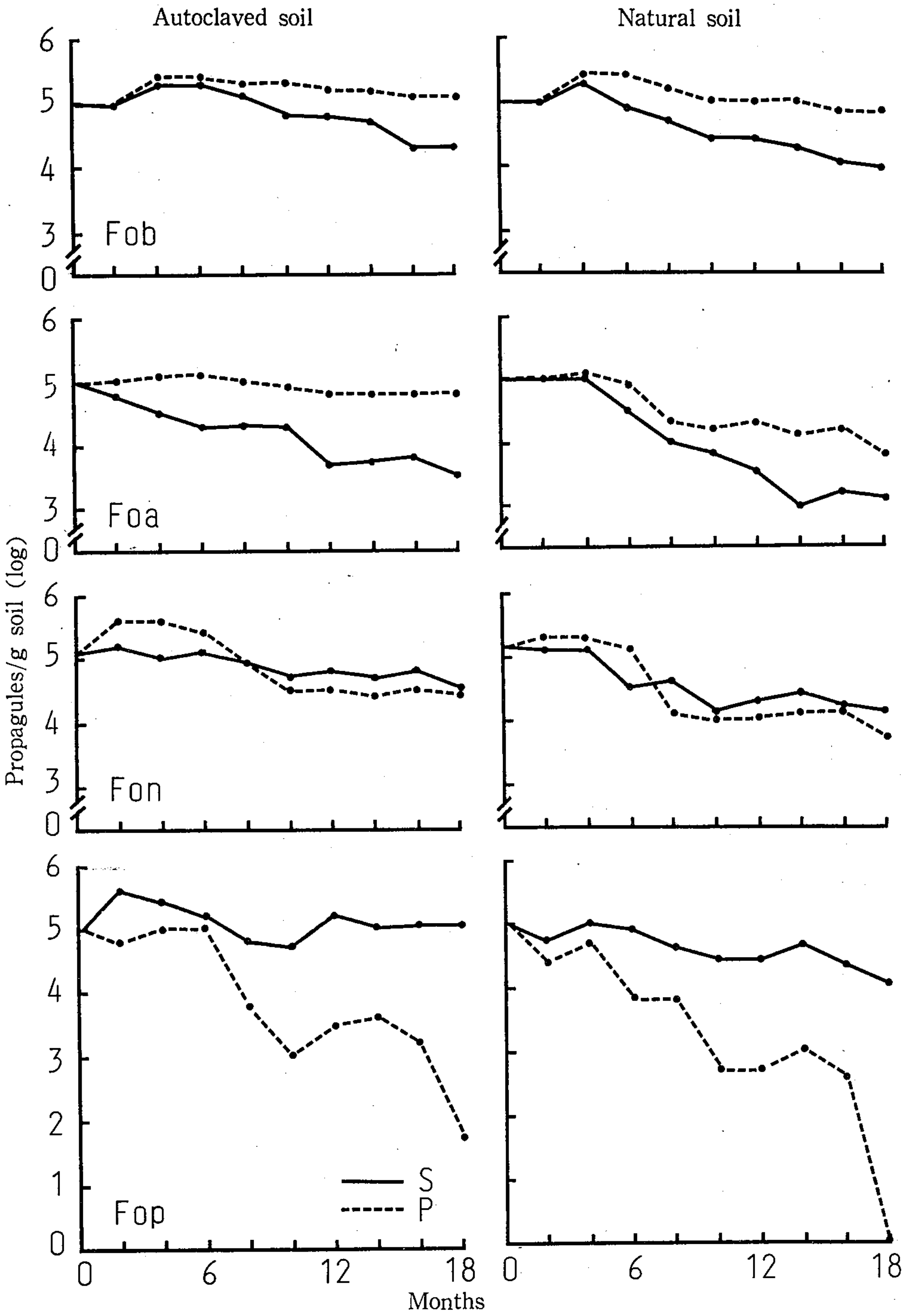
表二、豌豆接種萎凋病菌之野生型及變異型菌株之發病率

Table 2. Disease index of peas inoculated with wild type or varients of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2

Clone[1)]	Disease percentage (%)	
	Root dipping	Soil infestation
FOP-W	100	80
FOP-Rb	100	35
FOP-Rp	40	12
FOP-P	25	9
CK	0	0

1) FOP−W=Wild type; FOP−Rb=Brown ropy type; FOP−Rp=Purplish ropy type; FOP−P=Pionnotal type.

及 Fob 之粘膜型菌株則較胞叢型存活更好。反之，Fop 之粘膜型菌株卻無法存活。Fop 在消毒土中之族群數目，在 6 個月後開始下降，至16個月仍維持在 10^3 propagules/g of soil，但在第 18 個月則已降至 10^2 propagules/g of soil 以下。在自然土中，其族群數目則呈階梯式下降，至第十六個月則仍維持在 10^3 propagules/g of soil，但第十八個月後，則已降至無法偵測的範圍。



圖三、甘藷萎凋病菌（Fob），芹菜萎凋病菌（Foa），西瓜萎凋病菌（Fon）及豌豆萎凋病菌（Fop）在高壓殺菌土（左）及自然土（右）中之存活。S＝胞叢型；P＝粘膜型

Fig. 3. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (Fob), *F. oxysporum* f. sp. *apii* (Foa), *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon), and *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop) race 2 in autoclaved (left) and natural (right) soils. S=Sporodochial type; P=Pionnotal type

討　　論

鐮胞菌在培養基上有各種之培養形態，不同種鐮胞菌之野生型在形態上亦有差異[1,19]。最常見之變異型即所謂的粘膜型 （pionnotal type）。Pionnotes 乃 Fries 所創，用來描述鐮胞菌在培養基上產生鉅量密集的大孢子，外觀呈油脂狀（greasy appearance）[7]。但並非所有粘膜型菌株就是變異型，例如豌豆根腐病菌（*F. solani* f. sp. *pisi*）之野生型菌株即爲粘膜型[2,13]。前人研究粘膜型變異菌株，大都強調是培養基上產生的現象，甚少獲自田間標本[8]。著者自田間土壤或病害標本分離數百株豌豆萎凋病菌，雖然偶而獲得不同之培養性狀菌株，但這些野生型菌株，一律爲胞叢型，未有粘膜型者。將野生型菌株再次單孢分離培養，即可獲得許多不穩定的粘膜菌絲型，這些粘膜菌絲型培養後，又可產生胞叢型或繼續突變爲穩定的粘膜型。因之，變異方向爲

胞叢型⇄粘膜菌絲型⟶粘膜型。
（胞叢型⟶粘膜型）

這種在培養基上產生的變異菌株，到底是否存在於田間，或者它們在田間的行爲如何?!幾無資料可循。在文獻上，僅有 Oswald[17]研究 *F. roseum* f. sp. *cerealis* 時，曾經從病組織初生長菌絲所產生的最初20個孢子，偶而分離得粘膜型菌株，可見變異粘膜型菌株或許發生於自然界，但爲其他因素所抑制。許多報告[1,3,4,5,17,20,21,22] 顯示，這種變異菌株之致病力比原來之野生型弱。但鮮有研究其存活能力。Miller[14] 以香瓜蔓割病菌（*F. oxysporum* f. sp. *melonis*）爲例，發現在消毒土中變異菌株之致病力與野生型菌株相同，但在自然土中則較差，並且無法存活一年以上。於是 Miller[15] 提出兩個假說解釋其機構：1. 病原菌之遺傳性質在土壤中比在培養基上較爲穩定；2. 如果變異菌株存在田間，則存活能力較差。Lin[12]於1975年研究 *F. roseum* 'Avenaceum' 時，發現該病原菌極易由胞叢型變異爲粘膜型，粘膜型在無菌狀況下與野生型菌株有相等的致病力，但在自然土中則無，而且無法存活超過 2～3 wk。Lin[12] 並且解釋爲粘膜型菌株無法與土壤微生物競爭的緣故。最近，余和孫氏[1]和曾氏[4] 分別報告 *F. moniliforme* 和 *F. oxyspoum* f. sp. *apii* 的粘膜型與胞叢型菌株的存活能力並無差異，或者前者更能存活，可見鐮胞菌粘膜型菌株之存活能力，似乎因種類不同而異，但例證仍不夠充足，尚需逐一探討之。

本研究顯示，豌豆擬萎凋病菌（Fop）之粘膜型菌株，不論在浸根接種法（不受其他微生物干擾）或土壤接種法（受其他微生物干擾），其致病力皆已降低。顯然是粘膜型菌株本身的致病能力降低，微生物對它的影響僅是 9 % 與 25%的差異而已（表三）。另外，圖三的結果顯示，芹菜黃葉病菌（Foa），甘藷蔓割病菌（Fob）和西瓜蔓割病菌（Fon）之粘膜型菌株與胞叢型菌株之存活並無明顯差異，十八個月內仍維持在 10^3 propagules/g of soil 以上，這個族群數目是大多數萎凋病菌在田間之接種源臨界濃度（threshhold inoculum density）[6]，一般認爲此等菌株存活良好。但是，豌豆萎凋病菌粘膜型菌株顯然無法在土中存活。或許自然土中微生物的活動頻繁，故族群數目下降較快，而在消毒土中，起初微生物的活動因高壓殺菌而降至最低，故粘膜型菌株之族群數目在 6 個月內並不下降，後來或許消毒土中之微生物相重新建立，其族群數目才開始下降，但在時間上已較自然土中者爲緩。

Bruehl[8]在其評論文章中認爲：假如粘膜型菌株能從土壤中獲得，也僅是短暫現象，終將在土中消失。但是從我們的試驗結果及文獻資料顯示，鐮胞菌之變異複雜，各菌之變異互異，如豌豆萎凋病菌符合 Bruehl 氏之假說，但其他鐮胞菌則否，因種類不同而異。

引 用 文 獻

1. 余淑美、孫守恭。1979。*Fusarium moniliforme* 菌之變異。植保會刊 21:342-350。
2. 汪碧涵、林益昇 。1985 。豌豆萎凋及根腐病菌在水稻田裡之生態。植保會刊 27: 317-324。
3. 孫守恭、黃振文。1979。西瓜蔓割病菌變

異之研究。植保會刊 21:313-322。

4. 曾紫華。1983。芹菜黃葉病之研究。碩士論文。國立中興大學，植病系，臺中，臺灣。94 p。
5. 黃秀華。1980。甘藷蔓割病菌之變異。學士論文。國立中興大學，植病系，臺中，臺灣。47 p。
6. Baker, K. F., and Cook, R. J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Freeman and Company, San Francisco, U. S. A., 433 p.
7. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureau, England, 237 p.
8. Bruehl, G. W. 1976. Management of food resources by fungal colonists in cultivated soils. Annu. Rev. Phytopathol. 14:247-264.
9. Ebbels, D. L. 1967. Effect of soil fumigations on Fusarium wilt and nodulation of peas (*Pisum sativum* L.). Ann. Appl. Biol. 60:391-398.
10. Fleischmann, G. 1963. Studies on the wilt of peas caused by *Fusarium* oxysporum Schl. f. pisi (Linf.) S. & H., race 1. Can. J. Bot. 41:1569-1584.
11. Leonian, L. H. 1929. Studies on the variability and dissociation in the genus Fusarium. Phytopathology 19: 753-868.
12. Lin, Y. S. 1975. Fusarium root rot of lentils in the Pacific Northwest. Master Thesis, Washington State University, Pullman, WA., U. S. A. 60 p.
13. Lin, Y, S., Sun, W., and Wong, Pie-Han, 1984. Fusarium root rot and wilt of garden peas in Taiwan. Jour. Agric. Res. China 33(4):395-405.
14. Miller, J. J. 1945. Studies on the *Fusarium* of muskmelon wilt. I. Pathogenic and cultural studies with particular reference to the cause and nature of variation in the organism. Can. J. Res. 23:16-43.
15. Miller, J. J. 1946. Cultural and taxonomic studies on certain fusaria. I. Mutation in culture. Can. J. Res. 24:188-212.
16. Nash, S. M., and Snyder, W. C. 1962. Quantitative estimation by plete counts of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52:567-572.
17. Oswald, J. W. 1949. Cultural variation, taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* species associated with cereal root. Phytopathology 39:359-376.
18. Roberts, D. S., and Kraft, J. M. 1973. Enumeration of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 5 propagules from soil. Phytoptahology 63:765-768.
19. Snyder, W. C. 1933. Variability in the organism, *Fusarium orthoceras* var. *pisi*. J. Agric. Res. 47(2):65-88.
20. Ullstrup, A. J. 1955. Studies on the variability of pathogenicity and cultural characters of *Gibberella sambinetci*. J. Agric. Res. (U. S.) 51: 145-162.
21. Waite, B. H., and Stover, R. H. 1960. VI. Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Can. J. Bot. 38:985-994.
22. Wellman, F. L., and Blaisdell, D. J. 1941. Pathogenic and cultural variation among single-spore isolates from strains of the tomato-wilt *Fusarium*. Phytopathology 31:103-120.

Variation and Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* Race 2*

Yi-Sheng Lin[1], Pie-Han Wang[2] and Chaur-Tsuen Lo[1]

1. Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung; 2. Department of Microbiology, Soochow University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

(Accepted for publication: November 7, 1987)

ABSTRACT

Lin, Y. S., Wang, P. H., and Lo, C. T. 1988. **Variation and survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2**. Plant Prot. Bull. 30 : 15—23.

The colony of wild type of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 in Taiwan was sporodochial type. Various colonial types occurred in its single-spored subcultures. Ropy mycelial type was the unstable, intermediate phase, which could produce sporodochial type or continue to mutate to the pionnotal type. The pionnotal type was the stable, final stage of the variation. Frequency of variation increased in proportion to culture age on PDA. The wild type was highly pathogenic to garden peas (Taichung No. 11), while the variants were less pathogenic. The wild type isolate was also a strong survivor in both autoclaved and natural soils (8-10% of water content), but the pionnotal type isolate survived poor in soil. Besides, both pionnotal and sporodochial types of *F. oxysporum* f. sp. *apii*, and *F. oxysporum* f. sp. *batatas*, survived well, or the pionnotal type was survived better than the sporodochial type in both autoclaved and natural soils. The propagule densities of each fungus were still above 10^3 propagules/g of soil within 18 months. The variation of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* is similar to that of *F. oxysproum* f. sp. *pisi*, but the survival ability in soil is different.

Key words: garden peas, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2, Fusarium wilt pathogens, cultural variants, virulence, survival.

---

* Contribution No. 1356 from Taiwan Agricultural Research Institute.